

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2000-312588

(P2000-312588A)

(43) 公開日 平成12年11月14日 (2000.11.14)

| (51) Int.Cl. ⁷ | 識別記号 | F I | テキスト*(参考) |
|---------------------------|------|--------------|----------------|
| C 12 N 15/09 | ZNA | C 12 N 15/00 | ZNAA 4 B 0 2 4 |
| 1/15 | | 1/15 | 4 B 0 5 0 |
| 1/19 | | 1/19 | 4 B 0 6 3 |
| 1/21 | | 1/21 | 4 B 0 6 5 |
| 5/10 | | 9/04 | D |

審査請求 未請求 請求項の数14 O L (全 13 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平11-124285
 (22) 出願日 平成11年4月30日(1999.4.30)

(71) 出願人 506153357
 早出 広司
 東京都目黒区南1-13-16
 (72) 発明者 早出 広司
 東京都目黒区南1-13-16
 (74) 代理人 100089705
 弁理士 村本 一夫 (外5名)
 Fターム(参考) 4B024 AA11 BA08 HA01
 4B050 CC04 DD02 LL03
 4B063 QQ88 QR04 QR23 QR65 QS36
 QS38 QX01
 4B065 AA04Y BA16 CA28 CA46

(54) 【発明の名稱】 グルコース脱水素酵素

(57) 【要約】

【課題】 本発明は、改良されたグルコースに対する親和性を有する変形型水溶性PQQGDHを提供することを目的とする。

【解決手段】 ピロロキノリンキノンを補酵素とする水溶性グルコース脱水素酵素において、Acinetobacter calcoaceticus由来水溶性PQQGDHの第268残基から289残基に相当する領域において1またはそれ以上のアミノ酸残基が他のアミノ酸残基で置換されていることを特徴とする変形型グルコース脱水素酵素。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 ピロロキノリンキノンを補酵素とする水溶性グルコース脱水素酵素において、天然の水溶性グルコース脱水素酵素の1またはそれ以上のアミノ酸残基が他のアミノ酸残基で置換されており、かつ前記天然の水溶性グルコース脱水素酵素と比較してグルコースに対して親和性が向上していることを特徴とする改変型グルコース脱水素酵素。

【請求項2】 ピロロキノリンキノンを補酵素とする水溶性グルコース脱水素酵素において、*Acinetobacter calcoaceticus*由来水溶性PQQGDHの第268残基から289残基に相当する領域において1またはそれ以上のアミノ酸残基が他のアミノ酸残基で置換されていることを特徴とする改変型グルコース脱水素酵素。

【請求項3】 ピロロキノリンキノンを補酵素とする水溶性グルコース脱水素酵素において、*Acinetobacter calcoaceticus*由来水溶性PQQGDHの277番目のグルタミン酸残基に相当するアミノ酸残基が他のアミノ酸残基で置換されている改変型グルコース脱水素酵素。

【請求項4】 ピロロキノリンキノンを補酵素とする水溶性グルコース脱水素酵素において、*Acinetobacter calcoaceticus*由来水溶性PQQGDHの278番目のイソロイシン残基に相当するアミノ酸残基が他のアミノ酸残基で置換されている改変型グルコース脱水素酵素。

【請求項5】 ピロロキノリンキノンを補酵素とする水溶性グルコース脱水素酵素において、配列番号1で表されるアミノ酸配列の、第268残基から289残基の領域において、1またはそれ以上のアミノ酸残基が他のアミノ酸残基で置換されていることを特徴とする改変型グルコース脱水素酵素。

【請求項6】 配列番号1で表されるアミノ酸配列の277番目のグルタミン酸残基が他のアミノ酸残基で置換されている、請求項5記載の改変型グルコース脱水素酵素。

【請求項7】 配列番号1で表されるアミノ酸配列の278番目のイソロイシン残基が他のアミノ酸残基で置換されている、請求項5記載の改変型グルコース脱水素酵素。

【請求項8】 配列: Ser Glu Gln Gly Pro Asn Ser Asp Asp Xaa1 Xaa2 Asn Leu Ile Val Lys Gly Gly Asn Tyr Gly Trp [式中、Xaa1およびXaa2は任意の天然アミノ酸残基があるが、ただし、Xaa1がGluであるときXaa2はIleではない]を含む、ピロロキノリンキノンを補酵素とする水溶性グルコース脱水素酵素。

【請求項9】 請求項1～8のいずれかに記載の改変型グルコース脱水素酵素をコードする遺伝子。

【請求項10】 請求項9に記載の遺伝子を含むベクター。

【請求項11】 請求項9に記載の遺伝子を含む形質転換体。

【請求項12】 請求項9に記載の遺伝子が主染色体に組み込まれた生物。

【請求項13】 請求項1～8のいずれかに記載の改変型グルコース脱水素酵素を含むグルコースアッセイキット。

【請求項14】 請求項1～8のいずれかに記載の改変型グルコース脱水素酵素を含むグルコースセンサー。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明はピロロキノリンキノン(PQQ)を補酵素とするグルコース脱水素酵素(GDH)の特定のアミノ酸残基が他のアミノ酸残基で置換されている改変型PQQGDHに関する。本発明の改変型酵素は、臨床検査や食品分析などにおけるグルコースの定量に有用である。

【0002】

【従来の技術】 PQQGDHは、ピロロキノリンキノンを補酵素とするグルコース脱水素酵素であり、グルコースを酸化してグルコノラクトンを生成する反応を触媒する。

【0003】 PQQGDHには、膜結合性酵素と水溶性酵素があることが知られている。膜結合性PQQGDHは、分子量約87kDaのシングルペプチド蛋白質である。種々のグラム陰性菌において広く見いだされている。一方、水溶性PQQGDHは*Acinetobacter calcoaceticus*のいくつかの株においてその存在が確認されており(Biosci. Biotech. Biochem. (1995), 59(8), 1548-1555)、その構造遺伝子がクローニングされアミノ酸配列が明らかにされている(Mol. Gen. Genet. (1989), 217:430-436)。*A. calcoaceticus*由来水溶性PQQGDHは、分子量約50kDaのホモダイマである。他のPQQ酵素とは蛋白質一次構造上でホモジジーがほとんどなく、その機能と構造の相間にに関する研究はすくんでいないため、酵素安定化の指針となりうる知見はこれまでに得られていない。

【0004】 血中グルコース濃度は、糖尿病の重要なマークとして臨床診断上極めて重要な指標である。また、微生物を用いる発酵生産におけるグルコース濃度の定量がプロセスモニタリングにおいて重要な項目となっている。従来、グルコースはグルコースオキシダーゼ(GOD)あるいはグルコース6リン酸脱水素酵素(G6PDH)を用いる酵素法により定量されていた。しかし、GODを用いる方法ではグルコース酸化反応とともに発生する過酸化水素を定量するためカタラーゼある

いはバーオキシダーゼをアッセイ系に添加する必要があった。またGODを用いるバイオセンサーの開発も進められてきたが、反応が水溶液中の溶存酵素濃度に依存することから高濃度のグルコース試料には適さないこと、あるいは溶存酵素濃度によって測定値に誤差が生じる可能性があった。一方、G6PDHは分光学的手法に基づくグルコース定量に用いられてきたが、反応系に補酵素であるNAD(P)を添加しなければならないという煩雑性があった。そこで、これまでのグルコース酵素定量方法に用いられてきた酵素にかかる新たな酵素としてPQQGDHの応用が注目されている。PQQGDHはグルコースに対して高い酸化活性を有していること、およびPQQGDHは補酵素結合型の酵素であるため電子受容体として酵素を必要しないことから、グルコースセンサーの認識酵素をはじめとして、アッセイ分野への応用が期待されている。しかしながら、PQQGDHはグルコースに対する親和性が低いことという問題点があつた。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】したがって、本発明は、改良されたグルコースに対する親和性を有する改変型水溶性PQQGDHを提供することを目的とする。

【0006】

【課題を解決するための手段】本発明者は従来の水溶性PQQGDHを改良してそのグルコースに対する親和性を高め、廻床検査や食品分析などに応用できる改変型PQQGDHを開発すべく検査研究を行なった結果、水溶性PQQGDHの特定の領域においてアミノ酸変異を導入することにより、グルコースに対する親和性が大きめて高い酵素を得ることに成功した。

【0007】すなわち、本発明は、ビロロキノリンキノンを補酵素とする水溶性グルコース脱水素酵素において、天然の水溶性グルコース脱水素酵素の1またはそれ以上のアミノ酸残基が他のアミノ酸残基で置換されており、かつ前記天然の水溶性グルコース脱水素酵素と比較してグルコースに対して親和性が向上していることを特徴とする改変型グルコース脱水素酵素を提供する。好ましくは、本発明の改変型PQQGDHはグルコースに対するKm値は1.0 mM未満であり、天然型のPQQGDHのKm値の2.0 mMより低い。

【0008】本発明はまた、ビロロキノリンキノンを補酵素とする水溶性グルコース脱水素酵素において、Acinetobacter calcoaceticus由来水溶性PQQGDH(本明細書においては、野生型PQQGDHとも称される)の第268残基から289残基に相当する領域において1またはそれ以上のアミノ酸残基が他のアミノ酸残基で置換されている改変型グルコース脱水素酵素を提供する。なお、本明細書においては、アミノ酸の位置は、開始メチオニンを1として番号付けする。

【0009】本発明特に好ましい改変型PQQGDHは、配列番号1で表されるアミノ酸配列の第268残基から289残基の領域において、1またはそれ以上のアミノ酸残基が他のアミノ酸残基で置換されている。さらに好ましくは、本発明の改変型PQQGDHは、配列番号1で表されるアミノ酸配列の277番目のグルタミン残基が、アラニン、アスパラギン、リジン、アスパラギン酸、ヒスチジン、グルタミン、バリンおよびグリシンからなる群より選択されるアミノ酸残基で置換されているか、または278番目のイソロイシン残基がフェニルアラニン残基で置換されている。

【0010】また別の観点においては、本発明の改変型PQQGDHは、配列: Ser Glu Gin Gly Pro Asn Ser Asp Asp Xaa1 Xaa2 Asn Leu Ile Val Lys Gly Ily Asn Tyr Gly Trp[式中、Xaa1およびXaa2は任意の天然アミノ酸残基であるが、ただし、Xaa1がGluであるときXaa2はIleではない]を含む。

【0011】本発明はまた、上述の改変型グルコース脱水素酵素をコードする遺伝子、該遺伝子を含むベクターおよび該遺伝子を含む形質転換体、ならびに本発明の改変型グルコース脱水素酵素を含むグルコースアッセイキットおよびグルコースセンサーを提供する。

【0012】本発明の改変型PQQGDHの酵素蛋白質はグルコースに対して高い親和性を示し、かつグルコースに対して高い酸化活性を有していることから、グルコースの高濃度かつ高選択性的測定に応用できる。

【0013】

【発明の実施の形態】改変型PQQGDHの構造

本発明者は、水溶性PQQGDHをコードする遺伝子のコードイング領域中にエラーブローンPCR法によりランダムに変異を導入し、アミノ酸残基の変異が導入された水溶性PQQGDHのライブラリーを構築した。これを大腸菌に形質転換し、グルコースに対するPQQGDHの活性についてスクリーニングして、2.0 mM濃度のグルコースに対する活性が1.0 mMのグルコースに対する活性と同等であり、低濃度のグルコースに対して野生型酵素より反応性が向上したPQQGDHを発現する多数のクローンを得た。

【0014】これらのクローンの一つについて遺伝子配列を解析したところ、第277番目のGluがIleに置換されていることが判明した。さらにこの残基を種々の別のアミノ酸残基に置換したところ、いずれの残基に置換しても野生型水溶性PQQGDHよりもグルコースに対する親和性が向上した優れた変異酵素が得られた。次に、これらの結果に基づいて、他のアミノ酸残基の変異によるグルコースに対する親和性の向上の可能性について検討した。

【0015】これまでに水溶性PQQGDHと一次構造上類似する蛋白質がほとんど知られていないことから、その構造と機能の相間にに関する研究はほとんど進められ

ていなかった。そこで本発明者は、現在一般に知られている最も信頼できる蛋白質二次構造予測のひとつであり、ニューラルネットワークを基本としたアルゴリズムにより蛋白質二次構造を予測するプログラム、PHD法(Rost, B., PhD: Predicting one-dimensional protein structure by profile based neural networks, Methods Enzymol., 266, 525-539(1996))により水溶性PQQGDHの一次構造をもとに、水溶性PQQGDHの二次構造を予測した。その結果本酵素は30本の β ストランドから構成される β 蛋白質であることが示された。さらに、組み換えDNA技術を用いて*A. calcoaceticus*由来の野生型水溶性PQQGDHを大腸菌を用いて生産し、精製し、これを円二色性偏光回折光度計により解析した。得られたスペクトルより常法に従って、本酵素の二次構造含有量を測定したところ、 β ストランドが約4.5%であり、他の特徴的な二次構造を含有していないことを見いたした。さらに得られた二次構造含有量は先に示したPHD法による二次構造予測から得られた水溶性PQQGDHの二次構造とほぼ一致した。このことは、上述の水溶性PQQGDHの二次構造予測の妥当性を実験的に支持するものである。さらに、この二次構造のパターンに関してThreading method (Rost, B., Schneider, R. and Sander, C. Protein fold recognition by prediction-based threading, J. Mol. Biol., 270, 471-480(1997))によって同様な二次構造パターンを示す蛋白質を検索したところ、シリダーゼとガラクトースオキシダーゼと共に二次構造パターンをもっていることが予測された。シリダーゼとガラクトースオキシダーゼは2つとも β 蛋白質であり、その中でも β ストランド4本から構成されるW-モチーフと呼ばれる特徴的な構造が環状のプロペラ構造を形成する β プロペラ蛋白質である。シリダーゼは6つのW-モチーフから、ガラクトースオキシダーゼは7つのW-モチーフから構成されている β プロペラ蛋白質である。一方、これまでにPQQを補酵素とする酵素の中で唯一高次構造が明らかにされているPQQメタノール脱水素酵素もW-モチーフ8つから構成される β プロペラ蛋白質であることが明らかとなっている。これらのことから、水溶性PQQGDHも同様に β プロペラ蛋白質であると予測される。

【0016】これまでに β プロペラ蛋白質の基質認識に関する研究に関してはSodeらの膜結合性PQQGDHに関する一連の研究(Biootechnol. Lett., 19, 1073-1077(1997) Improved substrate specificity and dynamic range for glucose measurement of *Escherichia coli* PQQ glucose dehydrogenase by site directed mutagenesis, K. Sode and K. Kojima, Protein Engineering, 12, 63-70 (1999) Engineering a chimeric pyrrolequinoline quinone glucose dehydrogenase: improvement of EDTA tolerance, thermal stability and substrate specificity, by H. Yoshida et al.)およびCozierらによ

る構造予測モデルでの総説(Biochem. J., 312, 679-685 (1995) Structure of the quinoprotein glucose dehydrogenase of *Escherichia coli* modeled on that of methyl alcohol dehydrogenase from *Methylobacterium extorquens*)がある。これらの研究によれば、基質認識に関与する領域はループにあることが示唆されており、Sodeらの研究により、膜結合性PQQGDHのループに存在する77-75番目の残基であるH1sを他のアミノ酸残基に置換することにより、グルコースに対する親和性、ならびに基質特異性を改変できることが報告されている。

【0017】本発明においては、ループ領域の1つである第268残基から289残基の領域中の第277番目のGluを他のアミノ酸に置換することにより、グルコースに対する親和性が向上することが見いだされた。すなわち、本ループ領域中に適切な変異を導入することにより、水溶性PQQGDHにおいてもグルコースに対する親和性が向上したPQQGDHを構築しうることが立証された。

【0018】そこで、本ループ内の他の残基に關して部位特異的に変異を導入し、グルコースに対する親和性が向上を試みた。第268残基から289残基のループ領域中の、278番目のIleをPheに置換した改変型酵素、および279番目のAsnをH1sに置換した改変型酵素を作成し、その活性を測定したところ、予測されたように、これらの改変型酵素のグルコースに対する親和性が向上した。このことは、水溶性PQQGDHにおいては、このループ領域がその基質認識に重要な役割を担っており、この特定のループ領域には、変異を導入することによりグルコースに対する親和性を向上せざるアミノ酸残基が存在することを意味する。上記に示したGlu 277, Ile 278およびAsn 279残基は単なる例であり、本発明を限定するものではない。

【0019】すなわち、本発明は、ループ領域の構造遺伝子の特定の部位に変異を導入することによりPQQGDHのグルコースに対する親和性を改良できることを当該技術分野において初めて明らかにしたものであり、PQQGDHの基質特異性を改良する方法論がここで提供される。

【0020】本発明の好ましい改変型PQQGDHは、配列番号1で表されるアミノ酸配列の第268残基から289残基の領域において、1またはそれ以上のアミノ酸残基が他のアミノ酸残基で置換されている。さらに、本発明特に好ましい改変型PQQGDHは、配列番号1で表されるアミノ酸配列の277番目のグルタミン酸残基がアラニン、アスパラギン、リジン、アスパラギン酸、ヒスチジン、グルタミン、バリンおよびグリシンからなる群より選択されるアミノ酸残基で置換されているか、または278番目のイソロイシン残基がフェニルアラニン残基で置換されている。

【0021】また別の観点においては、本発明の改変型

PQQGDHは、配列：Ser Glu Gln Gly Pro Asn Ser Asp Asp Xaa1 Xaa2 Asn Leu Ile Val Lys Gly Gly Asn Tyr Gly Trp [式中、Xaa1およびXaa2は任意の天然アミノ酸残基であるが、ただし、Xaa1がGluであるときXaa2はIleではない]を含む。

【0022】本発明の改変型グルコース脱水素酵素においては、グルコースデヒドロゲナーゼ活性を有する限り、さらには他のアミノ酸残基の一部が欠失または置換されてもよく、また他のアミノ酸残基が付加されていてもよい。

【0023】さらに、当業者は、他の細菌に由来する水溶性PQQGDHについても、本発明の教示したがつてループ構造を有する領域を予測し、この領域内でアミノ酸残基を置換することにより、グルコースに対する親和性が向上した改変型グルコース脱水素酵素を得ることができる。特に、蛋白質の一次構造を並列して比較すること、あるいは当該酵素の一次構造をもとに予測された二次構造を比較することにより、*Acinetobacter calcoaceticus*由来の水溶性PQQGDHの第268残基から289残基のループ領域およびその領域における277番目のグルタミン酸残基および278番目のイソロイシンに相当するアミノ酸残基を容易に認識することができ、本発明にしたがって、かかるループ領域において1またはそれ以上のアミノ酸残基を他のアミノ酸残基で置換することにより、基質に対する親和性が改良された改変型グルコース脱水素酵素を得ることができる。これらは改変型グルコース脱水素酵素も本発明の範囲内である。

改変型PQQGDHの製造方法

*Acinetobacter calcoaceticus*由来の天然の水溶性PQQGDHをコードする遺伝子の配列は配列番号2で規定される。

【0024】本発明の改変型PQQGDHをコードする遺伝子は、天然の水溶性PQQGDHをコードする遺伝子において、上述のループ領域中に存在するアミノ酸残基をコードする塩基配列を、変異すべきアミノ酸残基をコードする塩基配列に置換することにより構築することができる。このような部位特異的塩基配列置換のための種々の方法が、当該技術分野において知られている。このようにして得た変異遺伝子を遺伝子発現用のベクター（例えばプラスミド）に挿入し、これを适当的宿主（例えば大腸菌）に形質転換する。外因性蛋白質を発現させるための多くのベクター・宿主系が当該技術分野において知られており、宿主としては例えば、細胞、酵母、培養細胞などの種々のものを用いることができる。

【0025】ランダム変異を導入する場合には、標的とするループ領域においてエラーブローンPCR法によりランダムに変異を導入し、ループ領域に変異が導入された変異水溶性PQQGDH遺伝子ライブリーパーを構築する。これを大腸菌に形質転換し、PQQGDHのグルコ

ースに対する親和性について各クローニングする。水溶性PQQGDHは大腸菌において発現させたときにペリプラズム空間に分泌されるため、菌体そのものを用いて容易に酵素活性の検定を行うことができる。このライブリーパーを20mMグルコース存在下で色素としてPMS-DClPを加え、PQQGDHの活性を目視により判定して、グルコース1.0mMに対する活性と同様な活性を示すクローニングを選択し、遺伝子配列を解析してその変異を確認する。

【0026】上のようにして得られた、改変型PQQGDHを発現する形質転換体を培養し、培養液から達心分離などで菌体を回収した後、菌体をフレンチプレスなどで破碎するか、またはオスマティックショックによりペリプラズム酵素を培地中に放出させる。これを超遠心分離し、PQQGDHを含む水溶性画分を得ることができる。あるいは、適当な宿主ベクター系を用いることにより、発現したPQQGDHを培養液中に分泌させることもできる。得られた水溶性画分を、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティクロマトグラフィー、HPLCなどにより精製することにより、本発明の改変型PQQGDHを調製する。

酵素活性の測定方法

本発明のPQQGDHは、PQQを補酵素として、グルコースを酸化してグルコノラクトンを生成する反応を触媒する作用を有する。

【0027】酵素活性の測定は、PQQGDHによるグルコースの酸化にともなって還元されるPQQの量を酸化還元色素の呈色反応により定量することができる。呈色試薬としては、例えば、PMS（フェナジンメタルフート）-DClP（2,6-ジクロロフェノールイドフェノール）、フェリシアシン化カリウム、フェロセンなどを用いることができる。

グルコースに対する親和性

本発明の改変型PQQGDHはグルコースに対する親和性が野生型の親和性より大幅に向上的している。すなわち、改変型PQQGDHのグルコースに対するKm値は全て1.0mM未満であり、野生型PQQGDHのグルコースに対するKm値2.0mMより大幅に低い。改変型PQQGDHの中でもE277Kのグルコースに対するKm値は3.8mMであり、また最大活性も野生型酵素と遜色ないことから、低い濃度のグルコースに対する反応性が向上している。

【0028】したがって、本改変型酵素を用いて作成されたアッセイキットあるいは酵素センサーはグルコース測定に際して感度が高く、低い濃度のグルコースが検出できるなどの優れた利点を有する。

グルコースアッセイキット

本発明はまた、本発明に従う改変型PQQGDHを含むグルコースアッセイキットを特徴とする。本発明のグルコースアッセイキットは、本発明に従う改変型PQQG

DHを少なくとも1回のアッセイに十分な量で含む。典型的には、キットは、本発明の改変型PQQGDHに加えて、アッセイに必要な緩衝液、メディエーター、キャリブレーションカーブ作製のためのグルコース標準溶液、ならびに使用の指針を含む。本発明に従う改変型PQQGDHは種々の形態で、例えば、凍結乾燥された試薬として、または適切な保存溶液中の溶液として提供することができる。好ましくは本発明の改変型PQQGDHはホロ化した形態で提供されるが、アボ酵素の形態で提供し、使用時にホロ化することもできる。

グルコースセンサー

本発明はまた、本発明に従う改変型PQQGDHを用いるグルコースセンサーを特徴とする。電極としては、カーボン電極、金電極、白金電極などを用い、この電極上に本発明の酵素を固定化する。固定化方法としては、架橋試薬を用いる方法、高分子マトリックス中に封入する方法、透析膜で被覆する方法、光架橋性ポリマー、導電性ポリマー、酸化還元ポリマーなどがあり、あるいはフェロセンあるいはその誘導体に代表される電子メディエーターとともにポリマー中に固定あるいは電極上に吸着固定してもよく、またこれらを組み合わせて用いててもよい。好ましくは本発明の改変型PQQGDHはホロ化した形態で電極上に固定化するが、アボ酵素の形態で固定化し、PQQを別の層としてまたは溶液中に提供することもできる。典型的には、グルタルアルデヒドを用いて本発明の改変型PQQGDHをカーボン電極上に固定化した後、アミン基を有する試薬で処理してグルタルアルデヒドをブロッキングする。

[0029] グルコース濃度の測定は、以下のようにして行うことができる。恒温セルに緩衝液を入れ、PQQ

およびCaCl₂、およびメディエーターを加えて一定温度に維持する。メディエーターとしては、フェリシアノ化カリウム、フェナジンメトサルフェートなどを用いることができる。作用電極として本発明の改変型PQQGDHを固定化した電極を用い、対極（例えば白金電極）および参照電極（例えばAg g / AgCl電極）を用いる。カーボン電極に一定の電圧を印加して、電流が定常になった後、グルコースを含む試料を加えて電流の増加を測定する。標準濃度のグルコース溶液により作製したキャリブレーションカーブに従い、試料中のグルコース濃度を計算することができる。

[0030]

【実施例】以下、実施例に基づいて本発明を詳細にするが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

実施例1

変異PQQGDH遺伝子ライブラリの構築およびスクリーニング

プラスミドpGB2は、ベクターpTrc99A（ファルマシア社製）のマルチクローニング部位に、Acinetobacter calcoaceticus由来PQQGDHをコードする構造遺伝子を挿入したものである（図1）。このプラスミドをテンプレートとして、エラーブローンPCR法によりコーディング領域中にランダムに変異を導入した。PCR反応は、表1に示す組成の溶液中で、9.4°C 3分間、次に、9.4°C 3分間、5.0°C 2分間、および7.2°C 2分間を30サイクル、最後に7.2°Cで10分間の条件で行った。

[0031]

[表1]

| | |
|-------------------------------|---------------|
| Taq qDNAポリメラーゼ (5 U/ μ l) | 0.5 μ l |
| テンプレートDNA | 1.0 μ l |
| フォワードプライマー-ABF | 4.0 μ l |
| リバースプライマー-ABR | 4.0 μ l |
| 1.0 \times Taqポリメラーゼバッファー | 10.0 μ l |
| 1M β -メルカプトエタノール | 1.0 μ l |
| DMSO | 10.0 μ l |
| 5 mM MnCl ₂ | 10.0 μ l |
| 1.0 mM dGTP | 2.0 μ l |
| 2 mM dATP | 2.0 μ l |
| 1.0 mM dCTP | 2.0 μ l |
| 1.0 mM dTTP | 2.0 μ l |
| H ₂ O | 51.5 μ l |
| | 100.0 μ l |

[0032] 得られた変異水溶性PQQGDHのライブラリーを大腸菌に形質転換し、形成された各コロニーをマイクロタイヤープレートに移した。コロニーを別のプレートにレプリカし、片方のプレートにはグルコース濃度1.0 mMおよびPMS-DCI Pを加入、他方のプレートには1.0 mMグルコースおよびPMS-DCI Pを加え、双方のPQQGDHの活性を目視で判定した。

2枚のプレートで同等のPQQGDHの活性を示すクローニングが多数得られた。

[0033] このうち1つのクローニングを任意に選び、遺伝子配列を解析したところ、第277番目のグルタミン酸がグリシンに変異していたことがわかった。

実施例2

変異型酵素PQQGDH遺伝子の構築

配列番号2に示されるAcinetobacter calcoaceticus由来PQQGDHの構造遺伝子をもとに、常に従って部位特異的変異法により277番目のグルタミン酸残基または278番目のイソロイシン残基をコードする塩基配列を所定のアミノ酸残基をコードする塩基配列に置換した。部位特異的変異はプラスミドpGB2を用いて、図2に示す方法により行った。変異に用いた合成オリゴヌ

クレオチドターゲットプライマーの配列を表2に示す。表2においては、例えば「E277A」は、277番目のグルタミン酸がアスパラギン酸に置換されていることを表す。

【0034】

【表2】

| | | | |
|-------|-----|--|-----|
| E277A | 5'- | GAG GTT AAT TGC ATC GTC AGA G | -3' |
| E277N | 5'- | C AAT GAG GTT AAT GTT ATC GTC AGA GTT TG | -3' |
| E277K | 5'- | GAG GTT AAT ATC ATC GTC AGA G | -3' |
| E277D | 5'- | GAG GTT AAT TTT ATC GTC AGA G | -3' |
| E277H | 5'- | C AAT GAG GTT AAT GTG ATC GTC AGA GTT TG | -3' |
| E277Q | 5'- | GAG GTT AAT TTG ATC GTC AGA G | -3' |
| E277V | 5'- | C AAT GAG GTT AAT TAC ATC GTC AGA GTT TG | -3' |
| E277G | 5'- | GAG GTT AAT TCC ATC GTC AGA G | -3' |
| 1278F | 5'- | C AAT GAG GTT GAA TTC ATC GTC AGA G | -3' |
| N279H | 5'- | GAC AAT GAG GTG AAT TTC ATC GTC AGA GTT | -3' |

ベクタープラスミドpKF18k(宝酒造(株))にAcinetobacter calcoaceticus由来PQQGDHをコードする遺伝子の一部を含むKpn I-Hind III断片を組み込み、これをテンプレートとする。このテンプレート50 fmolと宝酒造(株)製Mutant-1(接縫高橋)-E express Kmキットに付属のセレクションプライマー5 pmol、リン酸化したターゲットプライマー5 pmolを全量(20 μl)の1/10量の同キットのアニーリングバッファーとともに混合し、1,000℃、3分間の熱処理でプラスミドを変性させ、1本鎖にした。セレクションプライマーはpKF18kのカナマイシン耐性遺伝子上にある二重のアンバーバリアントを復帰させるためのものである。これを5分間氷上に置き、プライマーをアニーリングさせた。これに3 μlの両端ツエクステンションバッファー、1 μlのT4 DNAリガーゼ、1 μlのT4 DNAポリメラーゼおよび5 μlの滅菌水を加えて相補鎖を作成した。

【0035】これをDNAのミスマッチ修復能欠損株であるE.coli BMH71-18mutSに形質転換し、一晩振とう培養を行ってプラスミドを増幅させた。次に、ここで抽出したプラスミドをE.coli MV1184に形質転換し、そのコロニーからプラスミドを抽出した。そしてこれらのプラスミドについてシーケンスを行い、目的とした変異の導入を確認した。この断片を、プラスミドpGB2上の野生型PQQGDHをコードする遺伝子のKpn I-Hind III断片と入れ替え、変形型PQQGDHの遺伝子を構築した。

実施例3

変形型酵素の調製

野生型または変形型PQQGDHをコードする遺伝子を、E.coli用の発現ベクターであるpTrc99A(ファルマシア社)のマルチクローニングサイトに挿入し、構築されたプラスミドをE.coli DH5α株に形

質転換した。これを450mlのL培地(アンビシリソム0.5 μg/ml、クロラムフェニコール30 μg/ml含有)で坂口フラスコを用いて37℃で一晩振とう培養し、1mM CaCl₂、500 μM PQQを含む71%のL培地に接種した。培養開始後約3時間でソノブロビルチオガラクトシドを終濃度0.3 mMになるように添加し、その後1.5時間培養した。培養液から遠心分離(5000×g、10分、4℃)で菌体を回収し、この菌体を0.85%NaCl溶液で2回洗浄した。葉酸した菌体をフレンチプレスで破碎し、遠心分離(10000×g、15分、4℃)で未破砕の菌体を除去した。上清を超遠心分離(160500×g(40000r.p.m.)、90分、4℃)し、水溶性画分を得た。これを粗精製酵素標品として以下の実施例において用いた。

【0036】さらに、こうして得た水溶性画分を1.0 mMリン酸緩衝液pH7.0で一晩透析した。透析したサンプルを1.0 mMリン酸緩衝液pH7.0で平衡化した陽イオン交換クロマトグラフィー用充填カラムTSKgel CM-TOYOPEARL 650M(東リ株式会社)に吸着させた。このカラムを1.0 mMリン酸緩衝液pH7.0、7.50 mlで洗浄した後、0-0.2 M NaClを含む1.0 mMリン酸緩衝液pH7.0を用い、酵素を溶出させた。流速は5 ml/minで行った。GDH活性を有する画分を回収し、1.0 mM MOPS-NaOH緩衝液(pH7.0)で一晩透析した。このようにして電気泳動的に均一な変形型PQQGDH蛋白質を得た。これを精製酵素標品として以下の実施例において用いた。

実施例4

酵素活性の測定

酵素活性の測定は1.0 mM MOPS-NaOH緩衝液(pH7.0)においてPMS(フェナジメントサルフェート) - DCIP(2,6-ジクロロフェノールイ

ンドフェノール) を用い、D C I P の 6 0 0 nM の吸光度変化を分光光度計を用いて追跡し、その吸光度の減少速度を酵素の反応速度とした。このとき、1 分間に $1 \mu \text{mol}$ の D C I P が還元される酵素活性を 1 ユニットとした。また、D C I P の pH 7. 0 におけるモル吸光度は $1.6 \cdot 3 \text{ mM}^{-1}$ とした。

実施例 5

粗精製酵素標品グルコースに対する親和性の評価

実施例 3 で得られた野生型および各改変型 P Q Q G D H の粗精製酵素標品をそれぞれ $1 \mu \text{M}$ P Q Q, 1 mM C a C l₂ 存在下で 1 時間以上ホロ化した。これを $1.87 \mu \text{l}$ ずつ分注し、 $3 \mu \text{l}$ の活性試葉 (6 mM D C I P 4 $8 \mu \text{l}$, 6.00 mM P M P S 8 μl , 1.0 mM リン酸緩衝液 pH 7. 0 16 μl) やび各濃度の D-グルコース溶液 $1 \mu \text{l}$ を加え、実施例 4 に示す方法により室温で酵素活性を測定した。基質濃度対酵素活性のプロットから、Km を求めた。結果を表 3 に示す。

[0037]

[表 3]

| | Km (mM) |
|---------|---------|
| 野生型 | 26.0 |
| G 277 A | 1.5 |
| G 277 N | 1.2 |
| G 277 K | 8.9 |
| G 277 D | 7.4 |
| G 277 H | 7.7 |
| G 277 Q | 4.3 |
| G 277 V | 2.5 |
| G 277 G | 0.8 |
| I 278 F | 7.0 |
| N 279 H | 15.7 |

[0038] これまで報告されている野生型 P Q Q G D H のグルコースに対する Km 値は 20 mM である。これに対して、今回構築した 277 番目のグルタミン酸残基に変異を導入した酵素および 278 番目のイソロイシンをフェニルアラニンに置換した酵素では、いずれもグルコースに対する Km 値は 1 mM 未満であった。この結果から、本発明の改変型 P Q Q G D H はグルコースに対して高い親和性を有する酵素であることがわかる。

実施例 6

精製酵素標品のグルコースに対する親和性の評価

実施例 3 で得られた野生型酵素および E 277 K 改変型酵素の精製酵素標品を用いて、実施例 5 と同様にそれぞれ $1 \mu \text{M}$ P Q Q, 1 mM C a C l₂ 存在下で 1 時間以上ホロ化した。これを $1.87 \mu \text{l}$ ずつ分注し、 $3 \mu \text{l}$ の活性試葉 (6 mM D C I P 4 $8 \mu \text{l}$, 6.00 mM P M P S 8 μl , 1.0 mM リン酸緩衝液 pH 7. 0 16 μl) やび各濃度の D-グルコース溶液 $1 \mu \text{l}$ を加え、実施例 4 に示す方法により室温で酵素活性を測定し

た。基質濃度対酵素活性のプロットから、Km および V_{max} を求めた。E 277 K のグルコースに対する Km 値は約 $3 \cdot 8 \text{ mM}$ であり、V_{max} 値は 2771 U/mg であった。これまで報告されている野生型 P Q Q G D H のグルコースに対する Km 値は約 20 mM であり、V_{max} 値は測定上件により 2500 U/mg である。この結果から、E 277 K 改変型 P Q Q G D H はグルコースに対する親和性が大幅に向上了り、かつ、野生型 P Q Q G D H に匹敵する高い活性を有する酵素であることがわかる。

実施例 7

グルコースのアッセイ

改変型 P Q Q G D H を用いてグルコースをアッセイした。E 277 K 改変型酵素を、 $1 \mu \text{M}$ P Q Q, 1 mM C a C l₂ 存在下で 1 時間以上ホロ化し、各種濃度のグルコースおよび $5 \mu \text{M}$ P Q Q, 1.0 mM C a C l₂ 存在下で酵素活性を測定した。方法は実施例 4 に記載の酵素活性の測定法に準じ、D C I P の 600 nM の吸光度の変化を指標とした。図 3 に示されるように、E 277 K 改変型 P Q Q G D H を用いて、 $0 \cdot 1 \sim 20 \text{ mM}$ の範囲でグルコースの定量を行うことができた。

実施例 8

酵素センサーの作製および評価

5 U の E 277 K 改変型酵素にカーボンペースト 2.0 mg を加えて凍結乾燥させた。これをよく混合した後、既にカーボンペーストが約 4.0 mg 充填されたカーボンペースト電極の表面だけに充填し、滤紙上で研磨した。この電極を 1% のグルタルアルデヒドを含む 1 mM M O P S 緩衝液 (pH 7. 0) 中で室温で 30 分間処理した後、 2 mM リジンを含む 1 mM M O P S 緩衝液 (pH 7. 0) 中で室温で 20 分間処理してグルタルアルデヒドをロッキングした。この電極を含む 1 mM M O P S 緩衝液 (pH 7. 0) 中で室温で 1 時間以上平衡化させた。電極は 4°C で保存した。

[0039] 作製した酵素センサーを用いてグルコース濃度の測定を行った。本発明の改変型 P Q Q G D H を固定化した酵素センサーを用いて、 $0 \cdot 1 \text{ mM} \sim 5 \text{ mM}$ の範囲でグルコースの定量を行うことができる。

[0040]

【発明の効果】 改変型 P Q Q G D H はグルコースに対する親和性が高いことから、本酵素を用いてアッセイキットあるいは酵素センサーを作成すると従来の天然型の P Q Q G D H を用いた場合に比べ、より低濃度のグルコース測定が可能であり、また大幅な感度の向上といった利点が期待される。

[0041]

【配列表】

Sequence Listing

<110> Sode, Koji

<120> Glucose Dehydrogenase
 <130> 990387
 <160> 13
 <210> 1
 <211> 454
 <212> PRT
 <213> *Acinetobacter calcoaceticus*
 <400> 1
 Asp Val Pro Leu Thr Pro Ser Gln Phe Ala Lys Ala Lys Ser Glu Asn
 1 5 10 15
 Phe Asp Lys Lys Val Ile Leu Ser Asn Leu Asn Lys Pro His Ala Leu
 20 25 30
 Leu Trp Gly Pro Asp Asn Gln Ile Trp Leu Thr Glu Arg Ala Thr Gly
 35 40 45
 Lys Ile Leu Arg Val Asn Pro Glu Ser Gly Ser Val Lys Thr Val Phe
 50 55 60
 Gln Val Pro Glu Ile Val Asn Asp Ala Asp Gly Gln Asn Gly Leu Leu
 65 70 75 80
 Gly Phe Ala Phe His Pro Asp Phe Lys Asn Asn Pro Tyr Ile Tyr Ile
 85 90 95
 Ser Gly Thr Phe Lys Asn Pro Lys Ser Thr Asp Lys Glu Leu Pro Asn
 100 105 110
 Gln Thr Ile Ile Arg Arg Tyr Thr Tyr Asn Lys Ser Thr Asp Thr Leu
 115 120 125
 Glu Lys Pro Val Asp Leu Leu Ala Gly Leu Pro Ser Ser Lys Asp His
 130 135 140
 Gln Ser Gly Arg Leu Val Ile Gly Pro Asp Gln Lys Ile Tyr Tyr Thr
 145 150 155 160
 Ile Gly Asp Gln Gly Arg Asn Gln Leu Ala Tyr Leu Phe Leu Pro Asn
 165 170 175
 Gln Ala Gln His Thr Pro Thr Gln Glu Leu Asn Gly Lys Asp Tyr
 180 185 190
 His Thr Tyr Met Gly Lys Val Leu Arg Leu Asn Leu Asp Gly Ser Ile
 195 200 205
 Pro Lys Asp Asn Pro Ser Phe Asn Gly Val Val Ser His Ile Tyr Thr
 210 215 220
 Leu Gly His Arg Asn Pro Gln Gly Leu Ala Phe Thr Pro Asn Gly Lys
 225 230 235 240
 Leu Leu Gln Ser Gln Gln Gly Pro Asn Ser Asp Asp Glu Ile Asn Leu
 245 250 255
 Ile Val Lys Gly Gly Asn Tyr Gly Trp Pro Asn Val Ala Gly Tyr Lys
 260 265 270
 Asp Asp Ser Gly Tyr Ala Tyr Ala Asn Tyr Ser Ala Ala Ala Asn Lys
 275 280 285
 Ser Ile Lys Asp Leu Ala Gln Asn Gly Val Lys Val Ala Ala Gly Val
 290 295 300
 Pro Val Thr Lys Glu Ser Gln Trp Thr Gly Lys Asn Phe Val Pro Pro
 305 310 315 320
 Leu Lys Thr Leu Tyr Thr Val Gln Asp Thr Tyr Asn Tyr Asn Asp Pro
 325 330 335

<212> PRT
<213> Acinetobacter calcoaceticus
<220>
<222> 10
<223> Xaa is any amino acid residue except for Glu
<220>
<222> 11
<223> Xaa is any amino acid residue except for Ile
<400> 3
Ser Glu Gin Gly Pro Asn Ser Asp Asp Xaa Xaa Asn Leu Ile Val Lys
1 5 10 15
Gly Gly Asn Tyr Gly Trp
20
<210> 4
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> primer for point mutation
<400> 4
gagggtttttt gcatcgatcg ag 22
<210> 5
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> primer for point mutation
<400> 5
caatgggtttt aaatgtttatcg tcagatgttg 30
<210> 6
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> primer for point mutation
<400> 6
gagggtttttt tcaatcgatcg ag 22
<210> 7
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> primer for point mutation
<400> 7
gagggtttttt ttatcgatcg ag 22
<210> 8
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>

```

<223> primer for point mutation
<400> 8
caatgagggtt aatggatcg tcagatgttt      30
<210> 9
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> primer for point mutation
<400> 9
gagggttaatt tgcgttcag ag      22
<210> 10
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> primer for point mutation
<400> 10
caatgagggtt aatggatcg tcagatgttt      30
<210> 11
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> primer for point mutation
<400> 11
gagggttaatt ccatgttcag ag      22
<210> 12
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> primer for point mutation
<400> 12
caatgagggtt gaatgttcgt tcagat      26
<210> 13
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> primer for point mutation
<400> 13
gacaatgggtt gaaatgttcgt cgccatgttt      30

```

【図面の簡単な説明】

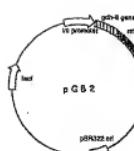
【図1】 図1は、本発明の変型酵素をコードする突然変異遺伝子を作成する方法を示す。

【図2】 図2は、本発明において用いたプラスミド

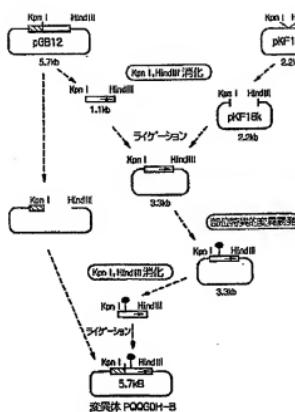
GB 2の構造を示す。

【図3】 図3は、本発明の変型PQQGDHを用いるグルコースのアッセイを示す。

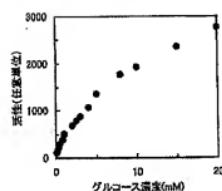
【図1】



【図2】



【図3】



フロントページの続き

(51) Int.CI.7 識別記号
 C 1 2 N 9/04
 C 1 2 Q 1/00
 1/32
 1/54
 G O 1 N 27/327
 //((C 1 2 N 15/09 ZNA
 C 1 2 R 1:01)

| F I | チ-マ-ド' (参考) |
|---------------|-------------|
| C 1 2 Q 1/00 | B |
| 1/32 | |
| 1/54 | |
| C 1 2 N 5/00 | A |
| G O 1 N 27/30 | 3 5 3 S |

L1 ANSWER 2 OF 2 WPINDEX COPYRIGHT 2003 THOMSON DERWENT on STN
AN 1999-341563 [29] WPINDEX
DNN N1999-256333

TI Counterweight support jig for elevator - has support jigs, installed on both sides of buffer absorbing device, which are mutually coupled vertically at upper and lower edges on same axis core.

DC Q38

PA (TOKE) TOSHIBA ELEVATOR TECHNOS KK; (TOKE) TOSHIBA KK

CYC 1

PI JP 11124285 A 19990511 (199929)* 7p B66B007-00 ←

ADT JP 11124285 A JP 1997-288066 19971021

PRAI JP 1997-288066 19971021

IC ICM B66B007-00

ICS B66B005-00; B66B011-00

/ BINARY DATA / 0308222002.TIF

AB JP 11124285 A UPAB: 19990723

NOVELTY - An oil filled buffer absorbing device (6) is installed to the lower side of a counterweight (2) in the central part of the pit (4) of a hoistway. Support jigs (11A), made of thin carbon steel pipes, are installed on both sides of the buffer absorbing device. The upper and lower edges of the support jigs are coupled vertically on the same axis core. DETAILED DESCRIPTION - An end plate is coupled to the upper and lower edges of each support jig. The upper and lower edges of the support jigs are coupled with bolts (19) that are passed to the end plate.

USE - For elevator.

ADVANTAGE - Simplifies maintenance and inspection works of the elevator at short period of time. Simplifies moving work of the support jigs on the floor in the pit. Eliminates coupling operation of the support jigs. DESCRIPTION OF DRAWING(S) - The figure shows the front elevation view of the counterweight support jig for elevator. (2) Counterweight; (4) Pit; (6) Oil filled buffer absorbing device; (11A) Support jigs; (19) Bolts.

Dwg.1/7

FS GMPI

FA AB; GI

START LOCAL KERMIT RECEIVE PROCESS

BINARY DATA HAVE BEEN DOWNLOADED TO MULTIPLES FILES 'IMAGEnnn.TIF'